

УДК 578.4; 579.678; 579.62

UDC 578.4; 579.678; 579.62

06.02.02 Ветеринарная микробиология, вирусология, эпизоотология, микология с микотоксикологией и иммунология

06.02.02 Veterinary microbiology, virology, epizootology, mycology with mycotoxicology and immunology

СРАВНЕНИЕ СТРУКТУРНОГО БЕЛКА ДЕНСОВИРУСА BMDNV-1 ТУТОВОГО ШЕЛКОПРЯДА С БЕЛКАМИ ВИРУСОВ БАКТЕРИЙ И АРХЕЙ ДЛЯ ИЗУЧЕНИЯ ВОЗМОЖНОСТИ ЛОЖНОПОЛОЖИТЕЛЬНЫХ ОТВЕТОВ ПРИ ИФА-ТЕСТИРОВАНИИ ГУСЕНИЦ

COMPARISON OF STRUCTURAL PROTEIN OF SILKWORM DENSOVIRUS BMDNV-1 WITH PROTEINS OF VIRUSES OF BACTERIA AND ARCHAEA TO STUDY THE POSSIBILITY OF FALSE POSITIVE ANSWERS IN THE ELISA - TESTING OF CATERPILLARS

Зимин Андрей Антонович

канд. биол. наук

AuthorID: 81249

dr.zimin8@yandex.ru

Институт биохимии и физиологии микроорганизмов им. Г.К. Скрыбина РАН – обособленное подразделение ФИЦ «Пушкинский научный центр биологических исследований РАН», Российская Федерация, г. Пушкино

Zimin Andrei Antonovich

Cand.Biol.Sci., AuthorID: 81249

dr.zimin8@yandex.ru

Institute of Biochemistry and Physiology of Microorganisms named after G. K. Scriabin RAS - a separate subdivision of the Federal Research Center "Pushchino Scientific Center for Biological Research of the Russian Academy of Sciences", Pushchino, Russia

Скобликов Николай Эдуардович

канд. мед. наук

SPIN-код: 6591-8710

skoblikow@yandex.ru

*ФГБНУ "Краснодарский научный центр по зоотехнии и ветеринарии", Российская Федерация, г. Краснодар
ООО «СЛ МедикалГрупп», Россия, г. Краснодар*

Skoblikov Nikolai Edwardovich

Cand.Med.Sci.

SPIN-code: 6591-8710

skoblikow@yandex.ru

*Krasnodar Research Centre for Animal Husbandry and Veterinary Medicine, Krasnodar, Russian Federation
"CL MedicalGroup" LTD, Krasnodar, Russia*

Назипова Нафиса Наилевна

канд. физ.-мат. наук

Researcher ID N-4270-2013

nnn@impb.ru

Институт математических проблем биологии РАН – филиал Института прикладной математики им. М.В. Келдыша РАН, г. Пушкино, Российская Федерация

Nazipova Nafisa Nailovna

cand.Phys.-Math.Sci.

ResearcherID N-4270-2013

nnn@impb.ru

Institute of Mathematical Problems of Biology RAS - the Branch of Keldysh Institute of Applied Mathematics of Russian Academy of Sciences, Pushchino, Russian Federation

Осепчук Денис Васильевич

Д-р с.-х. наук

SPIN-код: 6769-9879

osepchuk81@mail.ru

*ФГБНУ "Краснодарский научный центр по зоотехнии и ветеринарии", Российская Федерация, г. Краснодар
ФГБОУ ВО «Кубанский государственный аграрный университет имени И.Т. Трубилина», г. Краснодар, Российская Федерация*

Osepchuk Denis Vasilievich

Dr.Sci.Agr.

SPIN-code: 6769-9879

osepchuk81@mail.ru

*Krasnodar Research Centre for Animal Husbandry and Veterinary Medicine, Krasnodar, Russian Federation
Kuban State Agrarian University named after I. T. Trubilin, Krasnodar, Russian Federation*

Кошчаев Андрей Георгиевич

д. биол. н., профессор, член-корреспондент РАН

Scopus ID:57189599222 kagbio@mail.ru

ФГБОУ ВО «Кубанский государственный аграрный университет имени И.Т. Трубилина», г. Краснодар, Российская Федерация

Koshchaev Andrey Georgievich

Dr.Sci.Biol., Professor, Corresponding Member of RAS

Scopus ID:57189599222 kagbio@mail.ru

Kuban State Agrarian University named after I. T. Trubilin, Krasnodar, Russian Federation

Проведено сравнение аминокислотной последовательности структурного белка денсовируса BmDENV-1 тутового шелкопряда с последовательностями белков бактериофагов и вирусов архей в базе данных Genbank. Были обнаружены сходные аминокислотные последовательности у структурного белка денсовируса чешуекрылого и ряда последовательностей белков бактериофагов и вирусов архей. Был также проведен сравнительный филогенетический анализ этих последовательностей. Функция найденной общей аминокислотной последовательности была определена с помощью структурного моделирования на сервере SWISS-MODEL. Результаты данного разветвленного биоинформатического анализа говорят о возможности возникновения ложноположительных ответов при ИФА-тестировании гусениц тутового шелкопряда, кормов и мест содержания насекомых-производителей натурального шелка на наличие денсовируса. Замена ИФА-тестирования специфичным ПЦР выглядит логичным решением в этом случае

Ключевые слова: СТРУКТУРНЫЙ БЕЛОК ДЕНСОВИРУСА BMDNV-1, *DENSOVIRINAE*, ТУТОВЫЙ ШЕЛКОПРЯД *BOMBYX MORI*, БАКТЕРИОФАГИ СЕМЕЙСТВ *SPHYRNOVIRIDAE* И *PODOVIRIDAE*, ВИРУСЫ АРХЕЙ SSV1-TYPE

Silkworm densovirus BmDENV-1 structural protein amino acid sequence was compared with bacteriophage and archaea protein sequences in the Genbank database. Similar amino acid sequences were found in the structural protein of Lepidoptera densovirus and a series of bacteriophage and archaeal protein sequences. We have also performed a comparative phylogenetic analysis of these sequences. The function of the found common amino acid sequence was determined using structural modeling on a SWISS-MODEL server. The results of this branched bioinformatics analysis indicate the possibility of false-positive responses during ELISA testing of silkworm caterpillars, feed and insect-producing sites of natural silk for the presence of densovirus. Replacing ELISA testing with specific PCR seems to be a logical solution in this case

Keywords: DENSOVIRUS STRUCTURAL PROTEIN BMDNV-1, *DENSOVIRINAE*, *BOMBYX MORI*, BACTERIOPHAGES of the *SPHYRNOVIRIDAE* and *PODOVIRIDAE* FAMILIES, ARCHEY SSV1-TYPE VIRUSES

DOI: <http://dx.doi.org/10.21515/1990-4665-161-011>

Вирусы бактерий – бактериофаги и вирусы архей вездесущи. Различные бактерии и археи обитают как в теле данного насекомого, так и в местах их разведения. Тутовый шелкопряд имеет ряд инфекций бактериальной этиологии, что повышает содержание бактерий и их спутников бактериофагов в теле животного и производственных клетках для содержания [1-5]. Дополнительной актуальностью данных вопросов является использование гусениц тутового шелкопряда в качестве модельного организма для исследования инфекций, вызываемых такими возбудителями как *Staphylococcus aureus*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Vibrio cholerae*, *Escherichia coli* [2, 5-6].

Для разработки таких моделей денсовирусная инфекция представляет опасность не только в результате гибели модельных насекомых, но и с точки зрения неправильной количественной интерпретации результатов

доклинического исследования тех или иных лекарственных средств в следствии гибели гусениц от заражения вирусом. Заражение гусениц *Bombyx mori* бактериальным возбудителем для доклинических исследований антебактериальных лекарственных средств может приводить к значительному увеличению титра фагов – спутников той или иной бактерии. Наличие у белков этих вирусов сходства аминокислотных последовательностей со структурным белком VP3 денсовирусов тутового шелкопряда *Bombyx mori* (*Densovirinae*) может привести к ложноположительным ответам.

В работе мы поставили задачу: исследовать потенциальные структурные сходства белка денсовируса и белков бактериофагов и вирусов архей методами биоинформатики для прогнозирования возможных ошибок иммуноферментного анализа при тестировании гусениц тутового шелкопряда на инфекцию вирусом VmDENV-1.

Материалы и методы. Методы биоинформатики и программные средства, использованные в работе. Для изучения этого вопроса мы провели сравнение последовательности структурного белка денсовируса VmDENV-1 тутового шелкопряда с базой данных Genbank (через сайт пакета программ BLAST (1)) с помощью программного средства PSI-BLAST в одну или две итерации (2). Для сравнительного-эволюционного анализа последовательностей белков и построения филогенетических деревьев был использован пакет программ Мегаб (4).

Результаты исследований. Сравнительный анализ с базами данных аминокислотных последовательностей белков. При сравнении с вирусами архей, сходных с *Sulfolobus spindle-shaped virus 1* (SSV1-type phages (taxid:10474)) было обнаружено четыре последовательности с значением E от 0,62 до 6,5, с покрытием от 3 до 13% и процентом идентичности от 26,15% до 48,00%.

При сравнении с фагами семейства *Podoviridae* (phages with short tails (taxid:10744)) было обнаружено 12 последовательностей со значением E

от 0,0002 до 3,9, с покрытием от 12 до 23% процентов и процентом идентичности от 24,17% до 27,59%. Экспект (E) 0,002 был обнаружен для литической трансгликозилазы бактериофага Pavtok эрвиний (AXF51455.1). Был обнаружен ряд функционально сходных белков, участвующий в образовании капсида, как структурных, так и вспомогательных. Это были вспомогательные белки самосборки головки фагов *Escherichia virus VEc3* (AUE22262.1), *Escherichia virus K1E* (YP_425007.1), *Escherichia virus K1E* (AQY55005.1), *Escherichia virus AAPeс6* (ANT40833.1) и белок длинных фибрилл отростка фага *Klebsiella phage K1-ULIP33* (QAU05487.1). Высокий процент покрытия элайментом длины этих белков и процент идентичности около 25% указывают на то, что ряд случаев может оказаться весьма интересным с эволюционной точки зрения при исследовании происхождения и ранних случаев горизонтального переноса генетической информации при формировании структурных белков вирусов. Но между этими находками не было видно сходства внутри списка находок и каждый случай требует дальнейшего внимательного отдельного изучения, что мы надеемся сделать в будущем.

Близкая к предыдущей картина была обнаружена при исследовании сходств структурного белка денсовируса тутового шелкопряда с фагами семейства *Sphingoviridae* (phages with long non-contractile tails (taxid:10699)). Поиск выдал 14 хитов в области с низкой достоверностью (значение E от 0,92 до 9,4) и покрытие от 25% до 4%. С 25% покрытием длины белка элайментом и значением E – 0,92 была найдена метилаза фага микобактерий *Mycobacterium phage Cornucopia* (QBP31548.1), для большинства же найденных последовательностей функция было не известна, а среди однозначно аннотированных были белки связывающие нуклеотиды и бифункциональная праймаза – полимеразы. Эти находки можно интерпретировать с точки зрения взаимодействия структурного белка данного денсовируса с его геномной нуклеиновой кислотой за счет

сходного с найденными белками домена. Подобное сходство может говорить о полифункциональности отдельных доменов исследуемого белка и возможных древних событиях эволюции вирусов, которые также требуют отдельного рассмотрения по каждой.

При использовании подбазы (таксида) Tailed phages (taxid:28883), который согласно его названию должен был включать все бактериофаги, имеющие отростки, или бактериофаги отряда (порядка) Caudovirales было найдено 16 последовательностей, многие из которых не совпадали с находками, сделанными по другим таксидам, захватывающим семейства хвостатых бактериофагов. Статистическая характеристика E была от 0,99 до 9,8 и покрытие от 4 до 25%. Функция белков была сходна с более ранними находками в меньших по объему базах данных.

Был проведен поиск по подбазе данных бактериофага T4 и родственных ему фагов (T4 phage group (taxid:10663)), содержащих белки данной конкретной группы вирусов. После первой итерации поиск показал сходство с 18 последовательностями и с наибольшей частотой было встречено сходство с белком – ингибитором транскрипции хозяйской ДНК, продуктом гена *alc*. ДНК фага T4 и многих родственных ему бактериовирусов содержит неканонический нуклеотид – 5'-гидроксиметилцитозин вместо цитозина. Ряд функций нескольких белков фага направлен на снижение эффективности и исключение транскрипции ДНК бактерии-хозяина. Одной из таких функций является замедление движения аппарата транскрипции на ДНК канонического состава и обеспечивается белком *Alc*. Сходная последовательность покрывала 6% длины этого белка. Также было обнаружено сходство короткой последовательности из белка денсовируса с нуклеазой фагов, продуктом гена 46, ответственным за сегрегацию геномных ДНК при репликации. Вторая итерация работы программы PSI-BLAST привела к обнаружению уже 43 сходных последовательностей, 36 из которых были

последовательности белка А1с, кодируемыми геномами различных Т4-подобных бактериофагов.

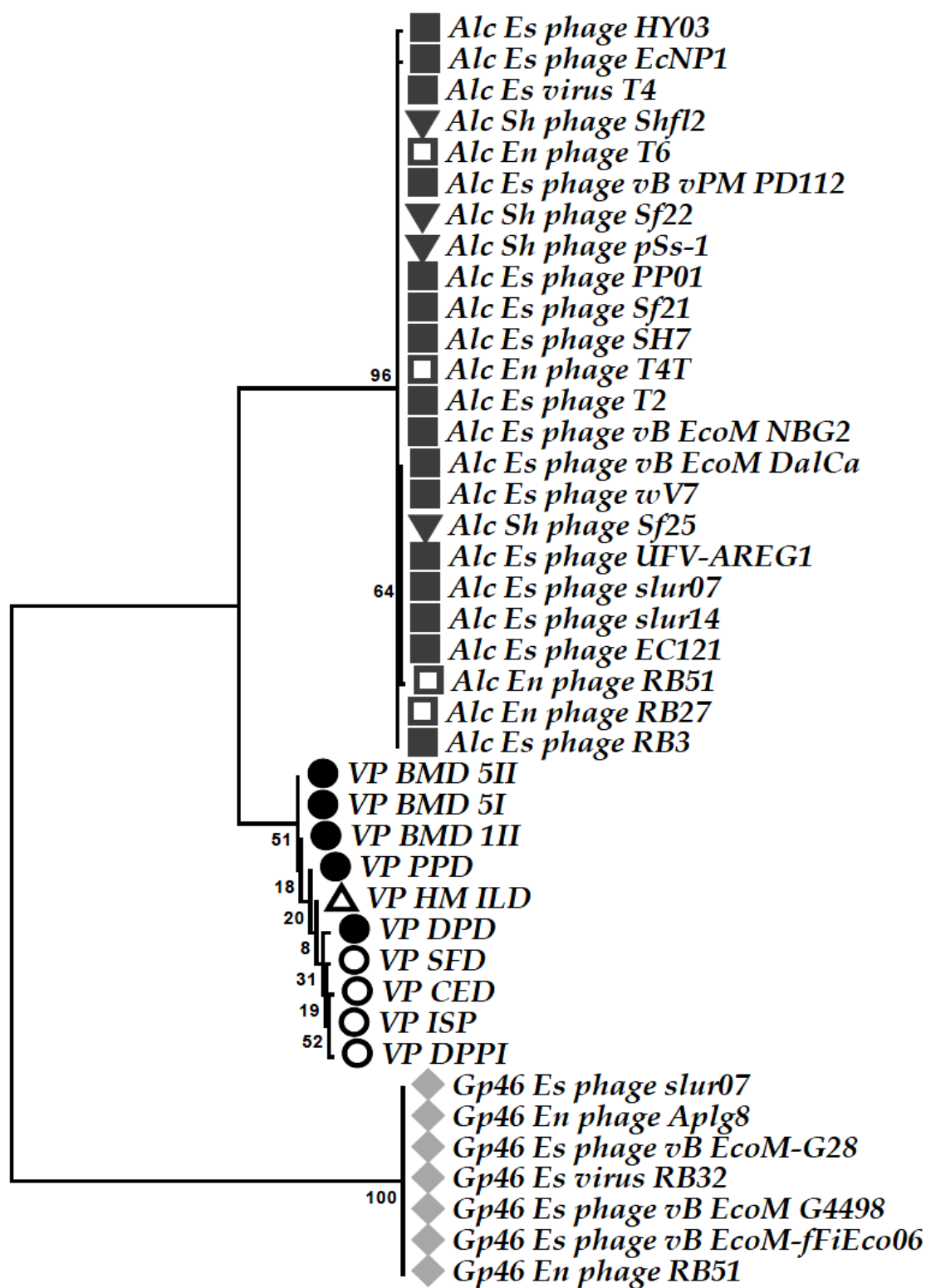
Эволюционный филогенетический анализ сходства структурного белка денсовируса тутового шелкопряда и белков бактериофагов. Мы провели более подробный анализ этого сходства. Для этого мы повели сохранение накладывающихся последовательностей, также вырезали сходный полипептид из последовательности структурного белка исследуемого денсовируса. Набор из 56 коротких аминокислотных последовательностей, имеющих свое происхождение из этих трех типов белков, был подвергнут обработке программой Clustal X [3] для получения множественного элаймента, и далее было построено эволюционное дерево методом максимального правдоподобия в пакете программ Мегаб (4). При этом последовательности из белков гомологов Gr46 использовали для определения корня дерева, так как последовательности сходных им полипептидов из белков денсовирусов не присутствовали в исследуемом наборе. Эволюционная история была выведена с помощью метода максимального правдоподобия, основанного на матричной модели JTT [5]. Исходное дерево было проверено с помощью 1000 повторностей бутстрап-анализа [6]. Ветви, соответствующие кластерам, воспроизведенным менее чем в 50% повторностей, были убраны. Исходное дерево для эвристического поиска было получено автоматически с использованием метода Maximum Parsimony. В анализе была использована 41 аминокислотная последовательность. Все позиции, содержащие пробелы и пропущенные данные, были исключены. Всего в итоговом наборе данных было 44 позиции. Эволюционный анализ был проведен в пакете MEGA6 [4].

На рисунке 1 представлено филогенетическое дерево найденных сходных последовательностей из эволюционно удаленных вирусов. Последовательности аминокислот структурных белков различных штаммов денсовируса тутового шелкопряда обозначены на дереве черными

заполненными кружками, аминокислотные последовательности структурных белков денсовирусов других чешуекрылых черными кольцами, других близких вирусов из одного кластера с этими последовательностями обозначены черными треугольниками.

Последовательности белка Alt-ингибитора транскрипции хозяйской ДНК бактериофагов – обозначены темно-серыми квадратами для фагов сходных с T4 и самого T4, для фагов рода T4 треугольниками с серой каймой, для T4-фагов бактерий рода шигелл обозначены темно-серыми треугольниками. Аминокислотные последовательности из белков-нуклеаз, продуктов гена 46 T4-подобных бактериофагов, обозначены светло-серыми ромбами.

Полученное дерево (Рис.1.) имело три ветви и ветвление структурных белков денсовирусов и ингибитора хозяйской транскрипции происходило от корня. Определенное в результате анализа эволюционное расстояние с одной стороны говорило о наличии искомого сходства найденных с помощью Psi-BLAST [2] сходных полипептидов, с другой стороны требовало дополнительного исследования для получения альтернативных доказательств.



0,01

Рисунок 1 – Филогенетическое дерево фрагментов последовательностей структурных белков денсовирусов, ингибитора транскрипции бактериофагов T4-типа и нуклеаза, продукта гена 46 этих же фагов.

Альтернативное исследование было проведено с помощью структурного моделирования этих полипептидов и поиска сходных трехмерных структур в БД PDB.

Структурное моделирование белков. Для того, чтобы выяснить функцию данной короткой последовательности мы провели структурное моделирование на сервере SWISS-MODEL (<https://swissmodel.expasy.org>). Наибольшее совпадение фрагмента последовательности структурного белка денсовируса было с SMTL ID : 6dj8.1 (Structure of DNA polymerase III subunit beta from *Borrelia burgdorferi*). Вероятно, сходство фрагмента репликативной ДНК-полимеразы бактерии, структурного белка денсовируса и ингибитора транскрипции бактериальной хромосомы, проявляется в связывании нуклеиновых кислот. Результаты моделирования определили, что функция этой короткой последовательности – бета-зажим, характерный для многих ДНК-полимераз (Beta sliding clamp), что и совпадало с нашим предположением.

Выводы

Последовательности сходные со структурным белком денсовируса тутового шелкопряда были найдены у ряда белков бактериофагов и вирусов архей. С помощью структурного моделирования на сервере SWISS-MODEL было показано, что общий домен для структурного белка VP3 денсовируса VmDENV-1, Alc-белков и Gp46-нуклеаз бактериофагов подсемейства *Tevenvirinae* несет функцию связывания нуклеиновых кислот.

Вероятно, что домен, общий для структурного белка денсовируса и белков бактериофагов, эволюционировал от прикрепления наружного белка вируса к его геномной РНК, далее к связыванию ДНК во время транскрипции, а одной из возникших позже функций данного белкового домена является зажим бета-типа у ДНК-полимераз бактерий.

Все находки, сделанные в этой работе, говорят о возможности возникновения ложноположительных ответов при ИФА-тестировании

гусениц тутового шелкопряда, кормов и мест содержания на наличие денсовируса.

Практическое предложение. Замена ИФА-тестирования специфичным ПЦР выглядит логичным решением в случае прогнозируемых ложноположительных ответов за счет потенциальной возможности взаимодействия антител к денсовирусу BmDENV-1 тутового шелкопряда с белками бактериофагов. На практике возможно и сочетание ПЦР – и ИФА – тестирования при поиске данного возбудителя у гусениц, в кормах и местах содержания производителей шелка.

Благодарности. Исследование было частично поддержано бюджетом ИБФМ РАН и частично поддержано для него же грантом РФФИ №20-54-53018 ГФЕН_а и выполнено им в рамках этого проекта, для Скобликова Н.Э. частично поддержано РФФИ и администрацией Краснодарского края и выполнено им в рамках гранта №19-44-230040-р_а, для Назиповой Н.Н. поддержано грантом РФФИ №19-07-00996_а.

Список литературы

1. Satoshi Nishida, Masaki Ishii, Yayoi Nishiyama, et al. *Lactobacillus paraplantarum* 11-1 Isolated from Rice Bran Pickles Activated Innate Immunity and Improved Survival in a Silkworm Bacterial Infection Model. *Frontiers in Microbiology*. 2017, Vol.8
2. Sneha Chinta, Shyam Kumar Vootla. Pharmacokinetic Evaluation of Ofloxacin in an Invertebrate Animal Model Silkworm, *Bombyx mori*. *Applied In Vitro Toxicology*. 2018, Vol.4, No.1, p.61.
3. Cheng T. C., Lin P., Jin S. K., Wu Y. Q., Fu B. F., Long R. W., Liu D. L., Guo Y. B., Peng L., Xia Q. Y. 2014. Complete genome sequence of *Bacillus bombysepticus*, a pathogen leading to *Bombyx mori* black chest septicemia. *Genome Announc.* 2: e00312-14.
4. Fagerlund A., Brillard J., Fürst R., Guinebretière M. H., Granum P. E. 2007. Toxin production in a rare and genetically remote cluster of strains of the *Bacillus cereus* group. *BMC. Microbiol.* 7: 43–45.
5. Feng W., Wang X. Q., Zhou W., Liu G. Y., Wan Y. J. 2011. Isolation and characterization of lipase-producing bacteria in the intestine of the silkworm, *Bombyx mori*, reared on different forage. *J. Insect. Sci.* 11: 1–10.
6. Uchiyama J, Takemura-Uchiyama I, Matsuzaki S. Use of a Silkworm Larva Model in Phage Therapy Experiments. *Methods Mol Biol.* 2019;1898:173-181. doi:10.1007/978-1-4939-8940-9_14.
7. Basic Local Alignment Search Tool. Режим доступа: <http://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi> . (Дата обращения 12.09.2019).
8. Altschul S.F., Madden T.L., Schäffer A.A., Zhang J., Zhang Z., Miller W., Lipman D.J. Gapped BLAST and PSI-BLAST: a new generation of protein database search programs. // *Nucleic Acids Res.* 1997. V. 25. P. 3389–3402.

9. Jeanmougin F., Thompson J.D., Gouy M., Higgins D.G., Gibson T.J. Multiple sequence alignment with Clustal X. // *Trends Biochem. Sci.* 1998. V. 23. P. 403–405.
10. Tamura K., Stecher G., Peterson D., Filipski A., and Kumar S. MEGA6: Molecular Evolutionary Genetics Analysis version 6.0. // *Molecular Biology and Evolution.* 2013. V. 30. P. 2725–2729. doi: 10.1093/molbev/mst197.
11. Jones D.T., Taylor W.R., and Thornton J.M. (1992). The rapid generation of mutation data matrices from protein sequences. // *Computer Applications in the Biosciences* 8: 275–282.
12. Felsenstein J. Confidence limits on phylogenies: An approach using the bootstrap. *Evolution.* 1985. V. 39. P. 783–791.

References

1. Satoshi Nishida, Masaki Ishii, Yayoi Nishiyama, et al. *Lactobacillus paraplantarum* 11-1 Isolated from Rice Bran Pickles Activated Innate Immunity and Improved Survival in a Silkworm Bacterial Infection Model. *Frontiers in Microbiology.* 2017, Vol.8
2. Sneha Chinta, Shyam Kumar Vootla. Pharmacokinetic Evaluation of Ofloxacin in an Invertebrate Animal Model Silkworm, *Bombyx mori*. *Applied In Vitro Toxicology.* 2018, Vol.4, No.1, p.61.
3. Cheng T. C., Lin P., Jin S. K., Wu Y. Q., Fu B. F., Long R. W., Liu D. L., Guo Y. B., Peng L., Xia Q. Y. 2014. Complete genome sequence of *Bacillus bombysepticus*, a pathogen leading to *Bombyx mori* black chest septicemia. *Genome Announc.* 2: e00312-14.
4. Fagerlund A., Brillard J., Fürst R., Guinebretière M. H., Granum P. E. 2007. Toxin production in a rare and genetically remote cluster of strains of the *Bacillus cereus* group. *BMC. Microbiol.* 7: 43–45.
5. Feng W., Wang X. Q., Zhou W., Liu G. Y., Wan Y. J. 2011. Isolation and characterization of lipase-producing bacteria in the intestine of the silkworm, *Bombyx mori*, reared on different forage. *J. Insect. Sci.* 11: 1–10.
6. Uchiyama J, Takemura-Uchiyama I, Matsuzaki S. Use of a Silkworm Larva Model in Phage Therapy Experiments. *Methods Mol Biol.* 2019;1898:173-181. doi:10.1007/978-1-4939-8940-9_14.
7. Basic Local Alignment Search Tool. Режим доступа: <http://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi> . (Дата обращения 12.09.2019).
8. Altschul S.F., Madden T.L., Schäffer A.A., Zhang J., Zhang Z., Miller W., Lipman D.J. Gapped BLAST and PSI-BLAST: a new generation of protein database search programs. // *Nucleic Acids Res.* 1997. V. 25. P. 3389–3402.
9. Jeanmougin F., Thompson J.D., Gouy M., Higgins D.G., Gibson T.J. Multiple sequence alignment with Clustal X. // *Trends Biochem. Sci.* 1998. V. 23. P. 403–405.
10. Tamura K., Stecher G., Peterson D., Filipski A., and Kumar S. MEGA6: Molecular Evolutionary Genetics Analysis version 6.0. // *Molecular Biology and Evolution.* 2013. V. 30. P. 2725–2729. doi: 10.1093/molbev/mst197.
11. Jones D.T., Taylor W.R., and Thornton J.M. (1992). The rapid generation of mutation data matrices from protein sequences. // *Computer Applications in the Biosciences* 8: 275–282.
12. Felsenstein J. Confidence limits on phylogenies: An approach using the bootstrap. *Evolution.* 1985. V. 39. P. 783–791.